AUTEURS CITÉS

1. Cigada, M., P. Citterio, A. Orlandi, S. Ranzi e L. Tosi. 1949. Ist. Lombardo (Rend. Sc.) 82: 351.
2. Cooper, R., S., J., exp. Zool. 101: 143, 1946; 107: 397, 1948; 114: 403, 1950.
3. Derrien, Y., E. P. Steyn-Parvé, M. Cotte and G. Laurent. 1952. Biochim. Biophys. Acta 9: 49.
4. Ebert, J. D. 1952. Proc. Nat. Ac. Sc., Washington 39: 333.
5. Ranzi, S. e P. Citterio. 1954. Boll. Soc. It. Biol. sper. 30: 517.
6. — Exp. Cell Res. (sous presse).
7. Rugh, R. 1952. *Experimental Embryology.* Burgess Company Minneapolis Min.
8. Spirito, A. 1937. Arch. Sc. Biol. 23:185.
9. Tenow, M. and O. Snellman. 1954. Bioch. Biophys. Acta 15: 395.

N° 16. **P. A. Tschumi,** Versuche über die Wachstumsweise von Hinterbeinknospen von *Xenopus laevis Daud.* und die Bedeutung der Epidermis.*

(Mit 4 Textabbildungen.)

(Dept. of Anatomy, University, Cambridge.)

I. Einführung.

Obwohl die Extremitätenentwicklung schon Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, ist dem Wachstum der Knospe bisher wenig Beachtung geschenkt worden. Eingehend untersucht wurde nur die Entwicklung der Flügelknospen bei Hühnchen durch Saunders (1948):

---

* Vorläufige Mitteilung. Eine ausführlichere und erweiterte Arbeit mit genaueren Angaben über Material und Methode und Diskussion der Literatur wird später anderswo publiziert. Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch die « Nuffield Foundation » und den Schweizerischen Nationalfonds ermöglicht.

Saunders zeigte durch Setzen von Vitalmarken, dass die Knospe an ihrem distalen Ende wächst. Auf das zuerst angelegte Oberarmmaterial wird sukzessive Unterarm-, Carpal- und Strahlen-Material aufgesetzt. Saunders fand, dass das distale Knospenwachstum von der Anwesenheit der apikalen Epidermisleiste abhängt: Nach deren Entfernung werden nur jene Flügelteile ausgebildet, die zur Zeit der Operation schon niedergelegt waren.

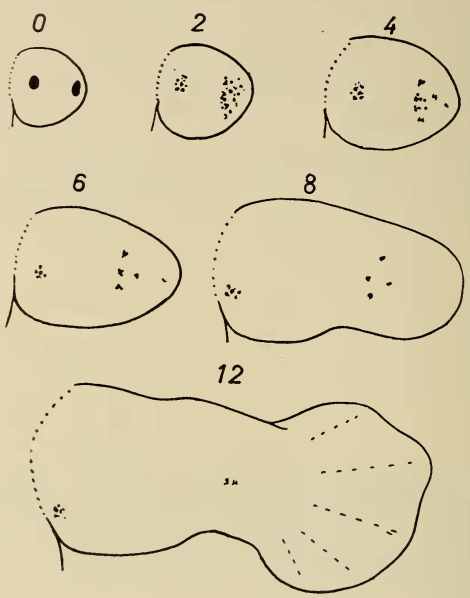

Abb. 1.
Verhalten distaler und proximaler Marken beim Wachsen der Beinknospe von *Xenopus*. Zahlen: Tage nach dem Setzen der Marken.

Entsprechende Befunde liegen für keine andern Typen vor. Die Untersuchungen von Steiner (1928) und Balinsky (1935) lassen aber auch bei Amphibien eine den Hühnchen entsprechende Bedeutung der Epidermis vermuten. Es war daher naheliegend, die Verhältnisse bei Amphibien näher zu untersuchen.

II. Markierungsexperimente bei *Xenopus*.

Zur Ermittlung der Wachstumsrate und der präsumtiven Bedeutung bestimmter Knospenbereiche wurden Marken ins Mesenchym

verschieden alter Hinterbeinknospen gesetzt. Hierzu wurde Karmin oder Tierkohlepulver mit destilliertem Wasser zu einem Brei zerrieben und mit einer feinsten Stahlnadel in das Knospenmesenchym eingeführt. Knospen und Marken wurden unmittelbar nach dem Eingriff und dann alle 2—5 Tage mit einem Zeichenapparat in Seitenansicht gezeichnet. Die vorliegende Arbeit stützt sich auf ca. 200 Markierungsversuche.

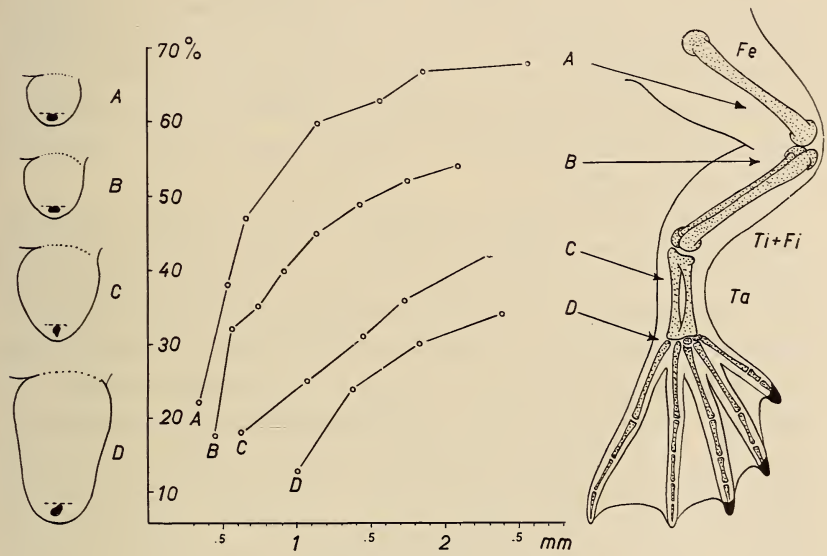

Abb. 2.

Links: Verschieden alte Beinknospen mit frischgesetzen distalen Marken.
Mitte: Abszisse: Länge der Knospe. Ordinate: Prozentualer Anteil der Distanz zwischen proximaler Markengrenze und Knospenspitze von der Gesamtlänge der Knospe (siehe Text).
Rechts: Beinbereiche, in die die proximalen Markenteilchen gelangen.
Fe = Femur; Ti + Fi = Tibia + Fibula; Ta = Tarsus.

Die meisten Marken liessen sich während 3—4 Wochen verfolgen. Sobald die knorpeligen Skelett-Teile des Beins ausgebildet waren, wurden die Larven fixiert. Die Marken konnten dann nach Färbung des Knorpels und Aufhellung (siehe Tschumi 1954, S. 194) lokalisiert werden.

Das Ergebnis dieser Markierungsversuche ist kurz zusammengefasst folgendes (siehe Abb. 1): Eine in proximale Knospenbereiche gesetzte Marke breitet sich zunächst nur wenig aus, und

beim Wachsen der Knospe nimmt ihre Entfernung von der Knospenspitze viel rascher zu als die Distanz zur Knospenbasis. In die Spitze der Knospe, dicht unter die distale Epidermis gesetzte Marken werden zunächst stark auseinandergezogen, um dann schliesslich in ihren Hauptteilen zurückzubleiben. Je nach dem Alter der Knospe finden sich solche ursprünglich distalen Marken endlich im Oberschenkel, Unterschenkel, Tarsus oder im Fuss (siehe Abb. 2).

Das Verhalten der Marken lässt sich objektiver fassen, wenn die Entfernung der proximalen Markengrenze von der Knospenspitze gemessen und der Anteil dieser Distanz von der Gesamtlänge der Knospe berechnet wird. Abbildung 2 zeigt, wie dieser Anteil im Laufe der Entwicklung erheblich zunimmt. Er fällt schliesslich umso grösser aus, je jünger die Knospe war, in deren Spitze die Marke gesetzt wurde.

Dieses Zurückbleiben der Marken wird am besten durch die Annahme gedeutet, dass die Knospe vor allem an ihrem distalen Ende wächst. Hier wird in einem besonderen Proliferationsbereich Extremitätenmaterial wie beim Hühnchen in proximo-distaler Reihenfolge niedergelegt. Nach den Marken bestünde eine 0,3 mm lange Knospe zur Hauptsache nur aus Oberschenkelmaterial. Die distaleren Abschnitte werden aus dem kleinen Mesenchymbereich hervorgehen, in welchen die Marke gesetzt wurde. Bei 0,5 mm langen Knospen sind Oberschenkel- und Unterschenkelmaterial niedergelegt. Es lässt sich so die prospektive Bedeutung von Knospen verschiedener Entwicklungsgrade ermitteln (siehe Abb. 2).

Nachdem sich die Knospe distal abgeflacht hat, wachsen die Strahlen, analog wie die junge Knospe, ebenfalls vorwiegend an ihrem distalen Ende: Neben oder in die Spitze eines Strahles gesetzte Marken werden zunächst gedehnt und bleiben dann zurück.

Nebst der distalen Proliferation findet ein Längen- und Breitenwachstum der schon niedergelegten proximaleren Knospenbereiche statt. Dies geht daraus hervor, dass sich auch die Entfernung zwischen proximalen und distalen Marken vergrössert (Abb. 1), und dass proximale Marken zeitweise stark in die Länge gezogen werden. Das Wachstum der distalen Bereiche ist aber stets intensiver. Dementsprechend finden sich bei jungen Beinknospen distal mehr Mitosen als proximal, wenn auch die Unterschiede gering sein sollen (siehe Bretscher 1949, S. 52).

III. Versuche über die Bedeutung der Epidermis beim Wachstum der Knospen.

Nachdem sich bei Hühnchen die apikale Epidermisleiste für das distale Wachstum als unentbehrlich erwies, lag es nahe, zu prüfen, ob die Epidermis auch bei *Xenopus* eine entsprechende

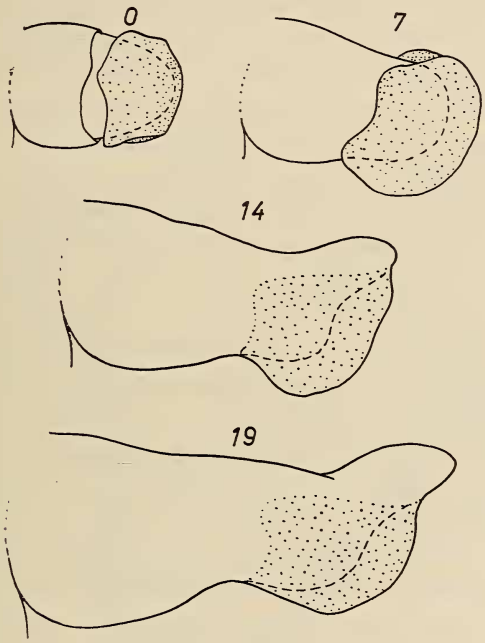

Abb. 3.
Entwicklung einer Beinknospe, der die distale Epidermis abgezogen und durch Kopfhaut ersetzt wurde. Unterbrochene Linie: Umriss des Knospenmesenchyms unter dem Transplantat (punktiert). Zahlen: Tage nach der Transplantation.

Rolle spielt. Bei Hühnchen wird entfernte Epidermisleiste nicht ersetzt. Ihre Bedeutung konnte daher durch Extirpation aufgezeigt werden. Bei Amphibien ist dies wegen der viel grösseren Restitutionsfähigkeit nicht möglich. Ich stellte daher unter andern folgende Versuche an:

Bei 10 Larven wurde der linken Beinknospe die distale Epidermis vorsichtig abgezogen. Auf das entblösste Mesenchym wurde ein Stück pigmentierte Kopfhaut transplantiert (Abb. 3). Die Knospen-

spitze sollte dadurch mit einer fremdartigen und weiter differenzierten Epidermis bedeckt werden, und so würde die Restitution der fehlenden Epidermiskappe verhindert.

Als Kontrollen wurde 8 Tieren die distale Knospenepidermis abgezogen und dann entweder in derselben oder in anderer Orientierung wieder aufgesetzt oder durch Epidermis anderer Beinknospen im gleichen Entwicklungsstadium ersetzt.

Die Epidermis wuchs bei den Kontrollknospen in 7 Fällen gut an, und jene entwickelten sich, abgesehen von leichteren Anomalien, zu vollständigen Extremitäten. Die transplantierte Kopfhaut wuchs in 6 Fällen gut an. Lebendbeobachtungen ergaben folgendes:

Wenige Tage nach der Transplantation wurde zwischen der Kopfepidermis und dem distalen Mesenchym eine allmählich dicker werdende Schicht eines lockeren und durchsichtigen Gewebes sichtbar. Dessen Anlage war wahrscheinlich zusammen mit der Kopfepidermis transplantiert worden. Unter dem Transplantat hatte das dichtere Knospenmesenchym also keinen direkten Kontakt mit der Epidermis. Es zeigte sich nun, dass sich aus diesem von der Epidermis getrennten Mesenchym keine distaleren Strukturen entwickelten. Es differenzierten sich daraus nur jene Teile, die zur Zeit der Transplantation schon niedergelegt waren:

Bei dem auf Abbildung 3 dargestellten Fall waren, nach den Markierungsversuchen zu schliessen, in der Knospe Oberschenkel-, Unterschenkel- und Tarsal-Material niedergelegt. Zunächst schien die ganze Knospenspitze vom Transplantat umhüllt zu sein. Später wichen aber, wenig dorsal von der Spitze, die Ränder des Transplantates etwas auseinander. Das distale Knospenmesenchym kam an dieser Stelle mit wahrscheinlich regenerierter Knospenepidermis in Kontakt, und hier wuchs der Lage entsprechend eine V. Zehe heraus. Die Entwicklung der übrigen Strahlen, die im Bereich des Transplantates hätten entstehen sollen, unterblieb vollständig (siehe Abb. 4, links).

Bei einer weiteren etwas älteren Knospe (Abb. 4, rechts) war zur Zeit der Transplantation nebst den Beinstammteilen auch schon proximales Metatarsalmaterial niedergelegt. Auch hier entwickelte sich hinter dem Transplantat eine 5. Zehe. Die übrigen Bereiche der Knospenspitze blieben aber mit lockerem Mesenchym und Kopfepidermis bedeckt, und hier differenzierten sich lediglich die proximalen Abschnitte zweier Metatarsalia (wahrscheinlich IV

und III). Entsprechende Beobachtungen wurden in den übrigen Fällen gemacht.

Aus den Markierungsexperimenten darf mit ziemlicher Sicherheit geschlossen werden, dass das Beinknospenwachstum bei *Xenopus* auf ähnliche Weise erfolgt wie beim Hühnchen: In einem

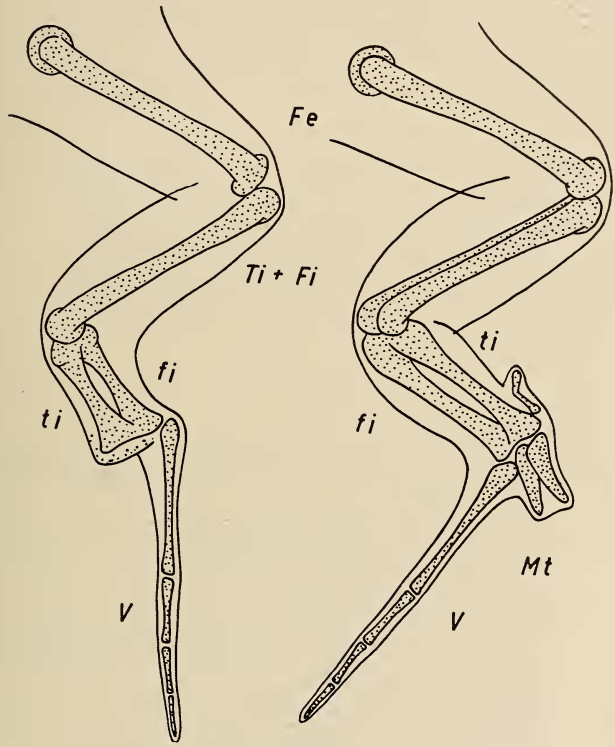

Abb. 4.
Links: Extremität der Knospe von Abb. 3 nach der Metamorphose.
Rechts: Extremität, die sich nach Transplantation von Kopfhaut auf eine etwas ältere Knospe entwickelte (siehe Text).
ti = tibiale; fi = fibulare; Mt = Metatarsus.

distalen Proliferationsbereich werden die präsumtiven Beinabschnitte in proximo-distaler Reihenfolge niedergelegt. Die Transplantationsversuche bestätigen diese Schlussfolgerungen. Sie sprechen ferner dafür, dass eine enge Beziehung zwischen Mesenchym und Epidermis Voraussetzung ist für das apikale Wachstum der Beinanlagen. Noch nicht abgeschlossene Versuche sind mit den hier besprochenen in Übereinstimmung und werden

voraussichtlich noch Aufschluss geben über die spezifische Funktion der Epidermis.

Summary.

By inserting carbon and carmin particles into the mesenchyme of growing hind limb buds of *Xenopus*, it was shown that the future limb parts are laid down in a proximo-distal sequence at the distal end of the bud. Transplantation of larval head skin over the tip of a bud, from which the epidermis had previously been stripped away, resulted in a suppression of further apical growth. This was most probably due to the separation of mesenchyme and epidermis by a layer of loose connective tissue, presumably transplanted with the head epidermis. It is concluded that a close contact between apical mesenchyme and epidermis is necessary for the apical growth of the limb bud.

LITERATUR

Balinsky, B. I. 1935. *Selbstdifferenzierung des Extremitätenmesoderms im Interplantat.* Zool. Jahrb. Allg. Zool. Physiol. 54: 327-348.

Bretscher, A. 1949. *Die Hinterbeinentwicklung von Xenopus laevis Daud. und ihre Beeinflussung durch Colchicin.* Rev. suisse Zool. 56: 33-96.

Saunders, J. W. 1948. *The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm.* J. exp. Zool. 108: 363-404.

Steiner, K. 1928. *Entwicklungsmechanische Untersuchungen über die Bedeutung des ektodermalen Epithels der Extremitätenknospe von Amphibienlarven.* Roux' Arch. 113: 1-11.

Tschumi, P. 1954. *Konkurrenzbedingte Rückbildungen der Hinterextremität von Xenopus nach Behandlung mit einem Chloraethylamin.* Rev. suisse Zool. 61: 177-270.